

Rec'd 24 MAR 2005

10/528998

PCT/JP03/12139

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 9月25日

REC'D 13 NOV 2003

出願番号
Application Number: 特願2002-279058
[ST. 10/C]: [JP 2002-279058]

WIPO PCT

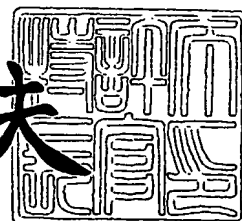
出願人
Applicant(s): 田畑 泰彦
米田 正始

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PTY-0004

【提出日】 平成14年 9月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府宇治市琵琶台 3-8-16

 【氏名】 田畑 泰彦

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市上京区室町通樫木町下ル大門町 256 御
 所西アーバンライフ 303

 【氏名】 米田 正始

【特許出願人】

 【識別番号】 599029420

 【氏名又は名称】 田畑 泰彦

【特許出願人】

 【識別番号】 500348664

 【氏名又は名称】 米田 正始

【代理人】

 【識別番号】 230104019

 【弁護士】

 【氏名又は名称】 大野 聖二

 【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

 【識別番号】 100106840

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 森田 耕司

 【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 185396

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 冠状動脈狭窄または閉塞治療用徐放性製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤からなる、冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための医薬組成物。

【請求項2】 血管新生因子がbFGFである、請求項1記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、冠状動脈狭窄または閉塞治療用の徐放性製剤に関する。より詳細には、本発明は、心臓の栄養動脈である冠状動脈の狭窄あるいは閉塞の治療のための血管新生因子含有徐放性製剤およびその製法、ならびにそれを用いた冠状動脈狭窄または閉塞の新しい治療法に関する。

【0002】

【従来の技術】

心臓外科領域においては、冠状動脈の狭窄にて起こる心筋虚血つまり狭心症と、病変進行の結果起こる心筋梗塞は、その早期発見と適切な治療が患者の生命を左右する重篤な疾患である。特に心筋梗塞は日本成人3大死因の一つであり、より効果的な治療の開発は急務である。降圧薬、血管拡張剤等の循環改善剤の投与によりこれらの病気の進展を遅らせることはできても、これはあくまで補助手段に過ぎず、根本治療ではない。狭窄・閉塞した血管に対し直接的な治療方法としては、冠動脈病変部位を機械的に押し広げる内科的カテーテル治療があるが、これには再狭窄の問題が伴うとともに、動脈硬化が強い場合にはその治療に限度がある。この場合残された治療方法は、外科的に血液供給源となる他の血管を病変箇所よりも遠位側に繋ぎ、新たな血液路（バイパス）を作成する冠動脈バイパス手術である。しかし直径が1mm未満の微少血管には技術的に吻合が困難であり、うまくバイパスしてもその血管径の違いや血流量不足から早期閉塞の運命を辿る。また直径1.5mmまたはそれ以上の血管はバイパス手術の適応であるが、

その末梢部や枝血管（とくにそれらの直径が小さいとき）に他の狭窄があると、バイパスの効果は低くなりその開存率も良くない。

【0003】

狭窄病変を複数の冠状動脈にび漫性に持つ重症の狭心症患者は、現段階では有効な治療方法がない為その予後は非常に不良である。虚血性心機能不全に伴う多臓器不全が併発した場合は致命的である。この危機的状況を打開する目的で、現段階で内科的（P C I または P T C A ・ステントなどのカテーテルインターベンション）・外科的（A C バイパスまたは C A B G、オフポンプ C A B G または O P C A B など）治療が適応とならない細血管が灌流する心筋領域に種々の血管新生因子を筋肉注射したり冠動脈内に注入する、あるいはレーザーで心臓外側から小孔を開けることで心筋内の側副血行の発達を促進する治療が開始されはじめているが、依然その効果は十分でない。いずれの方法にしても新生される血管は元来備わっている心筋内の血管の交通を拡充するに過ぎず、これにより増加する血液量は収縮力の低下した心機能を回復するには不十分である。したがって、当該技術分野においては、冠状動脈に十分な血液を供給するための新たな治療法の開発が求められている。

【0004】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

【特許文献1】

W094/27630

【特許文献2】

特開2001-316285

【特許文献3】

特開2002-145797

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、心筋領域における血管新生を促進することにより冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための新規な方法およびこれに用いるための製剤を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ゼラチンハイドロゲルを用いて作製した血管新生因子の徐放性製剤が、心筋梗塞モデルウサギにおいて顕著な治療的効果を有することを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤からなる、冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための医薬組成物を提供する。好ましくは、血管新生因子はbFGFである。

【0007】

本発明にしたがって、bFGFをゼラチンハイドロゲルに含浸させたシートを心筋虚血部位と多数の分枝を有する胃大網動脈の間に挟み込み徐放させることにより、血管新生効果を得られ、心臓外の血管から新生血管が誘導され、血流が増加して虚血改善が計られる。すなわち、本発明の徐放性製剤を用いることにより、心臓の外部から血管が誘導されるため、上記の細血管に従来の吻合方法（直径1.5mm以下とくに1mm以下の血管では成績が極めて悪い）を用いずにバイパスを繋ぐ、いわば”バイオバイパス（Bio-bypass）”を形成させることが可能となった。本発明は、重症の虚血性心疾患治療剤として特に有用である。

【0008】

本発明の徐放性製剤は、胃大網動脈（Gastroepiploic artery）ないし大網（greater omentum）と冠動脈（coronary artery）またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）、左または右内胸動脈（left or right internal thoracic artery）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）、および、左または右とう骨動脈（left or right radial artery）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）において用いるのに有用である。

【0009】

腹腔内で腸管を包み込むように存在する毛細血管の豊富な結合組織である大網

は右胃大網動脈を主要栄養動脈としている。この右胃大網動脈は冠動脈バイパス術のグラフト（新しい血液供給路）として汎用されており遠隔期開存率に優れる質の高い血管である。本発明の好ましい態様においては、徐放化した増殖因子を心臓と大網を含んだ右胃大網動脈の間に挟み込むように置き、この主要動脈から心筋へ血管を萌芽するバイオバイパスを形成させる。バイオバイパスによる血流増加は心筋内の側副血行発達のための血流増加よりも豊富であると考えられ、高い治療効果が期待される。これによりこれまで内科的、外科的に治療不可能とされていた重症虚血心の治療適応が拡大され、心不全や狭心痛に悩まされている患者に大きな福音をもたらす可能性がある。特に、心移植適応患者のなかで虚血性心筋症の患者にも有効である可能性がある。

【0010】

さらに、本発明にしたがえば、その他の動脈グラフト素材（生体内の血管において最も質の高い内胸動脈や大きな血管径を持つ撓骨動脈など）、さらには組織工学や遺伝子工学により改良された静脈グラフトや各種人工血管において適用することも可能であり、従来の外科治療と組み合わせることで幅広い治療戦略の展開が可能となる。

【0011】

すなわち、本発明の徐放性製剤は、静脈グラフト（大伏在静脈または小伏在静脈または上腕の静脈ないしそれらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）、人工血管グラフト（ゴアテックス（登録商標）（PTFE）またはダクロンなどと、それらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）、および生物系グラフト（ヒト動脈、静脈、動物由来の動脈、静脈あるいはそれらを脱細胞など組織工学的あるいは遺伝子工学的に改良したもの）と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管とのバイパス（吻合）において用いるのにも有用である。

【発明の実施の形態】

【0012】

本発明において用いることができる血管新生因子の例としては、塩基性線維芽

細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) およびその他のFGF、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、アンギオポイエチンなどの増殖因子、およびVEGFの発現を誘導する活性を有する低酸素誘導因子 (HIF) 等、ならびに、血管新生作用をもつサイトカイン、ケモカイン、アドレナメジュリンなどが挙げられる。

【0013】

本発明において血管新生因子として好ましいものはbFGFである。bFGFは、繊維芽細胞 (3T3) の増殖を促進する因子として最初に下垂体および脳から同定された成長因子である (Rifkin and Moscatelli, J. Cell Biol. 109, 1-6, 1989)。bFGFは、種々の組織および臓器において、血管新生、平滑筋細胞成長、小食治癒、組織修復、造血、神経細胞の分化等の多岐にわたる機能を有することが見いだされている (Bikfalvi, et al., Endocrine Rev., 18, 26-45, 1997)。bFGFは、欧米では虚血性心疾患の血管新生療法に臨床治療レベルで使用されており、日本では皮膚科領域では既に皮膚潰瘍治療薬として商品化され、整形外科領域では臨床治験で使用されている。

【0014】

本発明で使用されるゼラチンは、牛、豚、魚類などを始めとする各種の動物種の皮膚、骨、腱などの身体のあらゆる部位から採取できるコラーゲン、あるいはコラーゲンとして用いられている物質から、アルカリ加水分解、酸加水分解、および酵素分解等の種々の処理によって変性させて得ることができる。遺伝子組換え型コラーゲンの変性体ゼラチンを用いてもよい。ゼラチンの性質は、用いる材料および処理方法により様々であるが、そのいずれの性質をもつゼラチンも本発明においてbFGF等の血管新生因子の徐放のためのハイドロゲル材料として利用することができる。

【0015】

ゼラチンの性質を表す尺度としては、例えば、等電点、分子量、ジータ電位な

どがある。ジータ電位は、物質（ゼラチン）の静電的な荷電の程度を表す尺度である。本発明において用いるのに特に好ましいゼラチンは、以下の物性：

コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであり、

分子量が、SDS-PAGEの非還元条件下で約10～約20万ダルトンであり、

水溶液中のジータ電位が、約-15～約-20mV

を有するゼラチンである。また好ましくは、ウシの骨由来のI型コラーゲンをアルカリ処理して調製した酸性ゼラチンを用いることができ、新田ゼラチン社の試料等電点（IEP）5.0として入手することもできる。なお、酸処理して調製した塩基性ゼラチンは同じく新田ゼラチン社の試料IEP9.0として入手することができるが、ジータ電位は以下のように大きく相違する。

酸性ゼラチン（新田ゼラチン社試料IEP5.0）：約-15～約-20mV

塩基性ゼラチン（新田ゼラチン社試料IEP9.0）：約+12～約+15mV

【0016】

本発明で使用されるゼラチンハイドロゲルとは、上記ゼラチンを用いて種々の化学的架橋剤とゼラチン分子間に化学架橋を形成させて得られるハイドロゲルのことである。化学的架橋剤としては、例えばグルタルアルデヒド、例えばEDC等の水溶性カルボジイミド、例えばプロピレンオキサイド、ジエポキシ化合物、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、イミダゾール基などの間に化学結合を作る縮合剤を用いることができる。好ましいものは、グルタルアルデヒドである。また、ゼラチンは、熱処理又は紫外線照射によっても化学架橋することもできる。また、これらの架橋処理を組み合わせ用いることもできる。さらに、塩架橋、静電的相互作用、水素結合、疎水性相互作用などを利用した物理架橋によりハイドロゲルを作製することも可能である。

【0017】

ゼラチンの架橋度は、所望の含水率、すなわちハイドロゲルの生体吸収性のレベルに応じて適宜選択することができる。ゼラチンハイドロゲルを調製する際のゼラチンと架橋剤の濃度の好ましい範囲は、ゼラチン濃度1～20w/w%、架橋

剤濃度 0.01～1w/w%である。架橋反応条件は特に制限はないが、例えば、0～40℃、1～48時間で行うことができる。一般に、ゼラチンおよび架橋剤の濃度、架橋時間が増大するとともにハイドロゲルの架橋度は増加し、生体吸収性は低くなる。

【0018】

ゼラチンハイドロゲルの形状は、治療において用いるのに適した物であれば特に制限はないが、例えば、シート状、円柱状、角柱状、ディスク状、ペースト状、球状、粒子状などがある。

【0019】

円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のゼラチンハイドロゲルは、ゼラチン水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、あるいは、架橋剤水溶液にゼラチンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込んで、架橋反応させることにより調製することができる。また、成形したゼラチンゲルにそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン等のアミノ基を有する低分子物質に接触させるか、あるいは、pH 2.5以下の水溶液を添加する。反応に用いられた架橋剤および低分子物質を完全に除去する目的で、得られたゼラチンハイドロゲルは、蒸留水、エタノール、2-プロパノール、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

【0020】

球状、粒子状のゼラチンハイドロゲルは、例えば、三口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター（例えば、新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA miniD.C. スターラー等）とテフロン（登録商標）用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した装置にゼラチン溶液を入れ、ここにオリーブ油等の油を加えて200～600rpm程度の速度で攪拌し、W/O型エマルジョンとし、これに架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチン水溶液を予めオリーブ油中にて前乳化（例えば、ボルテックスミキサーAdvantec TME-21、ホモジナイザー、polytron PT10-35等を用いて）しておいたものをオリーブ油中に滴下し、微粒子化したW/O型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加して架橋反応させ、遠心分離によりゼラチンハイドロゲルを回収した後、アセトン、酢酸エチル等で洗浄し、

さらに2-プロパノール、エタノール等に浸漬して架橋反応を停止させることにより、調製することができる。得られたゼラチンハイドロゲル粒子は、2-プロパノール、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製に供される。ゼラチンハイドロゲル粒子が凝集する場合には、例えば、界面活性剤などの添加あるいは超音波処理（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。

【0021】

得られるゼラチンハイドロゲル粒子の平均粒径は、上述の粒子作製時におけるゼラチン濃度、ゼラチン水溶液とオリーブ油との体積比、および攪拌スピードなどにより変化する。一般には粒径は1～1000 μm であり、目的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けて使用すればよい。さらに、前乳化することによって、粒子サイズが20 μm 以下の微粒子状のゼラチンハイドロゲルを得ることができる。

【0022】

球状、粒子状のゼラチンハイドロゲルを調製する別法として以下の方法も挙げられる。上記の方法と同様の装置にオリーブ油を入れ、200～600 rpm程度の速度で攪拌し、ここにゼラチン水溶液を滴下してW/O型エマルジョンを調製し、これを冷却後、アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離により未架橋ゼラチン粒子を回収する。回収したゼラチン粒子を、さらにアセトン、酢酸エチル等、次いで2-プロパノール、エタノール等で洗浄後、乾燥させる。この乾燥ゼラチン粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む100mMグリシン水溶液又は0.1% Tween 80を含む0.004N HCl等にて洗浄し、架橋反応を停止することによりゼラチンハイドロゲル粒子を調製することができる。本法で得られるゼラチンハイドロゲル粒子の平均粒径は上記の方法の場合と同様である。

【0023】

本発明のゼラチンハイドロゲルは適宜、適当な大きさ及び形に切断後凍結乾燥し滅菌して使用することができる。凍結乾燥は、例えば、ゼラチンハイドロゲル

を蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上、又は-80℃で1時間以上凍結させた後に、凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行うことができる。

【0024】

以下に、bFGFを例として、本発明の血管新生因子含有徐放性製剤の製造方法をおよび使用方法を説明する。bFGF以外の血管新生因子を用いて本発明の徐放性製剤を製造および使用する方法は、本明細書の開示ならびに当該技術分野においてよく知られる技術に基づいて明らかであろう。

【0025】

本発明で使用されるbFGFは、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品を使用してもよい。bFGFの製造法としては、例えば、bFGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該bFGFを得ることができる。あるいは遺伝子工学的的手法によりbFGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えbFGFを得ることもできる。(例えば、Nature, 342, 440 (1989)、特開平5-111382号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989)などを参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母、昆虫、かいこ、または動物細胞などを用いることができる。このようにして得られたbFGFは、天然型bFGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

【0026】

本発明のbFGF含有徐放性ゼラチンハイドロゲル製剤は、例えば、上記の凍結乾燥したゼラチンハイドロゲルにbFGFを滴下して、ハイドロゲル内にbFGFを含浸させることにより得ることができる。この含浸操作は、通常、4-37℃で15分間-1時間、好ましくは4-25℃で15-30分間で終了し、そ

の間にハイドロゲルはbFGFで膨潤し、bFGFがゼラチン分子と相互作用することによってゼラチン分子と複合体を形成し、ゼラチンハイドロゲル内に物理的相互作用によって固定される。bFGFとゼラチンとの間の複合体の形成には、両者の間の静電的相互作用だけでなく、疎水結合、水素結合等の他の相互作用も大きく寄与していると考えられる。

【0027】

ゼラチンに対するbFGFの重量比は約5倍量以下であることが好ましい。さらに好ましくは、ゼラチンに対してbFGFは約5～約1/10⁴倍量の重量比である。

【0028】

本発明のbFGF徐放性ゼラチンハイドロゲル製剤は、bFGFの徐放性効果と安定化効果を持つため、bFGFの機能を少量で長時間にわたって発揮し得る。そのため、投与部位においてbFGFの血管新生促進機能が効果的に発揮されることによりバイオバイパスが形成され、冠状動脈狭窄または閉塞の治療剤として有効に作用することができる。

【0029】

この徐放のメカニズムは、bFGFが、ハイドロゲル内のゼラチンに物理的に固定化されていることに基づく。本発明者らは、これまで、成長因子、サイトカイン、モノカイン、リンホカイン、その他の生理活性物質などの生体吸収性高分子ハイドロゲルを用いた徐放化を試み、これにより他の材料では達成できない生理活性を有した有効成分の徐放化とその徐放期間のコントロールに成功してきた。本発明においては、bFGFが同様のメカニズムによってハイドロゲルから徐放され则认为られる。ゼラチンハイドロゲルに固定化された状態では、bFGFはハイドロゲルからほとんど放出されない。生体内でハイドロゲルが分解されるにつれて、ゼラチン分子が水可溶性となり、それに伴って、ゼラチン分子に固定化されているbFGFが放出されるようになる。すなわち、ハイドロゲルの分解によって、bFGFの徐放性を制御することができる。ハイドロゲルの分解性は、ハイドロゲル作製時における架橋程度を調節することにより変えることができる。また、bFGFがゼラチンと相互作用することによって、これらの生体内

での安定性、例えば酵素分解抵抗性などが向上する。

【0030】

本発明のゼラチンハイドロゲルは、その含水率が徐放性に大きく影響し、好ましい徐放性効果を示す含水率としては約80～99 w/w%が挙げられる。さらに好ましいものとしては、約95～98 w/w%のものが挙げられる。この架橋度の測定可能な指標に含水率がある。含水率が大きければ架橋度は低くなり、分解されやすくなる。つまり、この含水率の値がb F G Fの徐放（徐々に放出）を左右する。

【0031】

本発明の徐放性製剤は、血管新生因子をコードする遺伝子を含むものであってもよい。このような遺伝子は、細胞に導入されることによりその細胞内で機能を発現することができるような形態で用いる。例えば、導入された細胞内で当該DNAが転写され、それにコードされる血管新生因子が発現されるように構築されたプラスミドとして用いる。好ましくは、プロモーター領域、開始コドン、所望の機能を有する蛋白質をコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域が連続的に配列されている。

【0032】

このようなプラスミドは、当該技術分野において入手可能な種々のプラスミドに所望の血管新生因子をコードする遺伝子を適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。導入すべき遺伝子の塩基配列を基に合成、半合成の手段により調製することも可能である。

【0033】

血管新生因子をコードする遺伝子を含有するゼラチンハイドロゲルは、蛋白質である血管新生因子について上述した方法と同様にして作製することができる。例えば、ゼラチンの5～30重量%水溶液に直接架橋剤を添加して調製した架橋ゼラチンゲル、あるいは架橋剤水溶液に未架橋ゼラチンゲルを浸漬して調製した架橋ゼラチンゲルを遺伝子を含有する溶液中に直接浸漬するか、あるいは架橋ゼラチンゲルを乾燥した後、それを遺伝子を含有する溶液中で再膨潤させることによって調製することができる。核酸は負に荷電しているため、正に荷電している

ゼラチンハイドロゲルを用いることが好ましい。

【0034】

本発明の徐放性製剤は、冠動脈の近傍に外科手術により留置するか注射により投与することができる。具体的には、胃大網動脈ないし大網と冠動脈との間、左または右内胸動脈と冠動脈との間、左または右とう骨動脈と冠動脈との間等に留置または投与することができる。本発明の徐放性製剤が生体内で徐々に分解するのにもなって血管新生因子が放出され、血管新生因子の作用によりこれらの血管と冠動脈またはその枝あるいは毛細血管との間に新生血管が誘導され、バイオバイパスが形成される。このことにより、虚血心臓への血流が増加し、冠状動脈狭窄または閉塞の有効な治療を達成することができる。

【0035】

あるいは、静脈グラフト（大伏在静脈または小伏在静脈または上腕の静脈ないしそれらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）、人工血管グラフト（ゴアテックス（登録商標）（PTFE）またはダクロンなどと、それらを組織工学的・遺伝子工学的に改良したもの）、および生物系グラフト（ヒト動脈、静脈、動物由来の動脈、静脈あるいはそれらを脱細胞など組織工学的あるいは遺伝子工学的に改良したもの）等を用いて冠動脈バイパス手術を行う際に、本発明の徐放性製剤を病変部位またはその近傍に留置することができる。この場合にも、本発明の徐放性製剤が生体内で徐々に分解するのにもなって血管新生因子が放出され、血管新生因子の作用によりこれらのグラフトと冠動脈またはその枝あるいは毛細血管との間に新生血管が誘導され、バイオバイパスが形成されて血流が増加する。さらに、本発明の徐放性製剤は、人工血管グラフトと細胞移植（心筋細胞、骨格筋芽細胞、骨髄細胞ないし骨髄由来細胞、骨髄単核球細胞、ES細胞およびそこから分化させた細胞など）を使用したバイパス手術においても有効に用いることができる。

【0036】

【実施例】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0037】

実施例 1. bFGF 含有ゼラチンハイドロゲルの作製

10wt%濃度の酸性ゼラチンをグルタルアルデヒドにより化学架橋した後、架橋剤を不活性化した。次に蒸留水にて数回洗浄し、架橋含水率90.3%ゼラチンハイドロゲルを得た。続いて100 μ gのbFGFを含む0.05M濃度のリン酸緩衝液(pH 7.4, PBS 500 μ l)を滴下し、bFGF水溶液をゼラチンハイドロゲルへ浸み込ませることによってbFGF含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。

【0038】

実施例 2. 心筋梗塞ウサギモデルの作成および治療

体重2.5-3.5kgの日本白色ウサギを用いて、全身麻酔下に胸骨正中切開で心臓を露出した。抗不整脈剤を投与下に冠動脈の枝(回旋枝)を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。術後心室細動に移行することがあり、約20分間経過を観察し状態が安定することを待った。

次に、これらの心筋梗塞ウサギモデルに、bFGF含有ゼラチンハイドロゲルによる治療を施した。

グループA (n = 5) : 無処置 (心筋梗塞作成のみ)

グループB (n = 10) : 開腹し採取した大網を含んだ右胃大網動脈を心臓に巻き付ける

グループC (n = 10) : シート状のbFGF含有ゼラチンハイドロゲルを右胃大網動脈と心臓の間に投与する

bFGFの投与は、これを含有させたハイドロゲルシートを細い糸で心臓表面に固定することにより行った。これらの条件下では、bFGFは約2週間にわたり局所で徐放される。

【0039】

実施例 3. 超音波検査による心臓機能評価

術前、2週目、4週目の超音波検査で心臓機能評価を行った。軽い鎮静下に体表超音波検査を施行した。いずれの群も手術前の心機能は良好であり、差はなかった。2週目、4週目でグループCにおいて有意に心臓収縮能が良好であり、心

機能が保たれていることが判明した。

【0040】

実施例 4. 大網動脈造影検査による評価

術後 4 週目にグループ B, C について大網の動脈の造影検査を行った。グループ B, C のそれぞれ 6 匹ずつに造影検査を施行した。全身麻酔下に抗凝固を施し再開腹した。大網動脈に 24 G カテーテルを挿入した。動物を犠牲死させ、大網と心臓を一塊に取り出した。あらかじめ挿入しておいたカテーテルより造影剤を注入し、これを撮影した後に、現像したフィルムを解析した。

グループ B では 6 匹中 2 匹において大網動脈から冠動脈が描出されたが、その新生血管発育は非常に乏しいものだった。一方グループ C では 6 匹全部において冠動脈への交通を認め、新生血管は非常に豊富であり冠動脈との交通を全てに認めた。

【0041】

実施例 5. 組織学的検査による評価

4 週間の治療期間の後、心臓標本を摘出し、心筋梗塞の範囲を組織学的に検討した。また免疫染色を行い、梗塞境界部位の毛細血管の数を調べ比較検討した。摘出した心臓を冠動脈結紮部位より 2 mm 心尖部よりで心臓長軸に対して水平断にスライスした。これをマッソン・トリクローム染色し、左心室全体に占める心筋梗塞領域を算出した。

梗塞領域については、グループ C は A, B に比べ有意に小さかった。免疫染色（血管壁の α アクチン平滑筋細胞を染色）による細動脈の単位面積当たりの数は、グループ C が他の 2 群に比較し有意に増加していた。

以上の結果から、b F G F 含有ゼラチンハイドロゲルによる血管新生作用により、心臓外の血管が冠動脈と連結し（バイオバイパス）、虚血心臓の血行改善が得られることで、有意に心機能の悪化を予防し、心筋梗塞領域を縮小させることができた。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 心筋領域における血管新生を促進することにより冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための新規な方法およびこれに用いるための製剤を提供すること。

【解決手段】 血管新生因子またはこれをコードする遺伝子およびゼラチンハイドロゲルを含む徐放性製剤からなる、冠状動脈狭窄または閉塞を治療するための医薬組成物が開示される。血管新生因子としては、例えば、bFGFおよびその他のFGF、VEGF、HGF、PDGF、TGF、アンギオポイエチン、HIF、サイトカイン、ケモカイン、アドレナメジュリン等を用いることができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 7 9 0 5 8

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[5 9 9 0 2 9 4 2 0]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 3 月 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府宇治市琵琶台 3 - 8 - 1 6

氏 名

田畑 泰彦

特願 2002-279058

出願人履歴情報

識別番号

[500348664]

1. 変更年月日

2000年 7月26日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市上京区室町通樫木町下ル大門町256 御所西ア

ーバンライフ303

氏 名

米田 正始